



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 41 359 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

⑲ Aktenzeichen: 199 41 359.2
⑳ Anmeldetag: 31. 8. 1999
㉑ Offenlegungstag: 1. 3. 2001

DE 199 41 359 A 1

⑦ Anmelder:
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit GmbH, 85764 Oberschleißheim, DE

⑦ Vertreter:
PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner, 80801
München

⑦ Erfinder:
Meier, Harald, 81247 München, DE

⑤ Entgegenhaltungen:
Datenbank Gebank bei STN,
LOCUS(LOC):PAU38445
GenBank(R) zu: GenBank ACC.NO.(GBN):U38445;
Datenbank Gebank bei STN,
LOCUS(LOC):PSERR16SA
GenBank(R) zu: GenBank ACC.NO.(GBN):M59154;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤ Schneller, hochspezifischer Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* durch Mehrfachsondendetektion
⑤ Die vorliegende Erfindung beschreibt einen schnellen, hochspezifischen molekularen Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*.

BEST AVAILABLE COPY

DE 199 41 359 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Mittel zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*, Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa* sowie die Verwendung des erfindungsgemäß offenbarten Mittels.

Vertreter der Bakterienart *Pseudomonas aeruginosa* sind in der Umwelt (z. B. in Oberflächengewässern) weit verbreitete Keime. Sie sind Gram-negativ, benötigen Sauerstoff zum Wachstum (aerob) und sind Oxidase positiv. In der Regel wachsen sie bei 41°C unter Anwesenheit von Cetyltrimethylammoniumbromid (Cetrimide) im Nährmedium, bilden die Pigmente Pyocyanin und Pyoverdin (fluoreszieren unter UV-Anregung schwach blaugrün), bilden Nitrat und Nitrit und sind sensitiv gegenüber Polymyxin. Sie sind in der Lage, ein breites Nährstoffspektrum zu verwerten und können sich selbst bei einem sehr geringen Angebot an verwertbaren Kohlenstoff-Quellen vermehren. Nur ein kleiner Teil aller Keime der Bakterienart *Pseudomonas aeruginosa* ist pathogen. Diese ubiquitäre Bakterienart hat allerdings erhebliche sekundäre pathogene Bedeutung als opportunistischer Keim im Zusammenhang mit Hospitalismus.

Im Rahmen sogenannter nosokomialer (= im Krankenhaus erworbener) Infektionen kann *Pseudomonas aeruginosa* Wundinfektionen, Sepsis, Endokarditis, Entzündungen des Urogenitaltraktes, insbesondere aber Infektionen des Respirationstraktes einschliesslich Lungenentzündungen verursachen. Insbesondere immun-supprimierte Patienten sind häufig davon betroffen. Patienten mit Neutropenie oder zystischer Fibrose haben in der Regel bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* sehr schlechte Prognosen. Eine schnelle und spezifische Früherkennung dieses Keims ist deshalb in der Medizin, insbesondere in der medizinischen Diagnostik, von großer Bedeutung.

In der Getränkeindustrie ist dieser Keim zudem ein wertvoller Indikator für Kontaminationen mit Oberflächenwasser und unhygienischer Produktion. Daher müssen laut gesetzlicher Verordnungen in Deutschland und Europa, z. B. der Verordnung über Mineral-, Quell- und Tafelwasser, abgefüllte Produkte, die Mineral-, Quell- oder Tafelwasser enthalten, auf das Vorhandensein dieses Keims überprüft werden.

Konventionelle Verfahren, die auf der Anzucht dieser Keime in Reinkultur und nachfolgender Identifizierung des Phänotyps beruhen, sind langwierig und nicht immer eindeutig. Dies beruht auf der Eigenschaft dieses Keims und nahe verwandter Organismen (*Pseudomonaden*), genetisches Material von anderen Keimen aufzunehmen und auch den zugehörigen Phänotyp auszubilden. Ferner sind Beispiele bekannt in denen einige Stämme von *Ps. aeruginosa* sonst typische Eigenschaften (wie z. B. Bildung des Pigmentes Pyocyanin) nicht mehr zeigen, gelegentlich auch vollständig verloren haben.

Eine Aufgabe der Erfindung ist die Beschreibung eines schnell durchführbaren, hochspezifischen Verfahrens zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* sowie die Nennung der hierfür notwendigen Materialien.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Mittel zum Nachweis von *Ps. aeruginosa* gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es zumindest zwei Sonden mit je zumindest zehn aufeinanderfolgenden Nukleotiden der nachfolgenden zwei Sequenzen enthält:

PAE1: 5'-tca ctc cgt ggt aac cgt ccc cct tgc ggt tag act agc tac ttc tg-3'

PAE2: 5'-tct cct tag agt gcc cac ccg agg tgc tgg taa cta ag-3'

und/oder zumindest ein oder zwei Derivate dieser Sequenzen, die je in Kombination von zumindest zwei dieser Sequenzen zum spezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa* geeignet sind.

5 Weiterhin wird ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa* mit den nachfolgenden Verfahrensschritten offenbart:

Inkontaktbringen der DNA oder der RNA einer auf die Anwesenheit von *Ps. aeruginosa* zu untersuchenden Probe mit
10 zumindest den zwei Sonden PAE1 und PAE2 und/oder ihren Derivaten und Nachweis der Hybridisierung der Sonden mit der RNA oder der DNA der Probe, um das Vorliegen von *Ps. aeruginosa* spezifischer DNA- und/oder RNA-Sequenzen aufzuzeigen.

15 Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen sowie der nachfolgenden Beschreibung und den Ausführungsbeispielen. Die Erfindung ist nicht auf die nachfolgend genannten bevorzugten Ausgestaltungen beschränkt, sondern umfaßt sämtliche, unter die Patentansprüche fallenden Ausführungsformen, auch wenn sie nachfolgend nicht speziell genannt sind.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren basiert auf dem Nachweis definierter Nukleinsäureabschnitte von *Ps. aeruginosa*, wobei hochspezifisch Sequenzen der 16S ribosomalen Ribonukleinsäure (16S rRNS) von *Pseudomonas aeruginosa* sowie hiervon abgeleiteter Stämme selektiv erkannt werden. Das erfindungsgemäß bereitgestellte Mittel kann zur schnellen Identifizierung von *Ps. aeruginosa* eingesetzt werden, da weder eine selektive Anzucht von *Ps. aeruginosa* zu Reinkulturen noch die Ausbildung eines definierten Phänotyps notwendig sind. Es differenziert sicher und reproduzierbar *Ps. aeruginosa* von anderen, nahe verwandten *Pseudomonas*-Arten, beispielsweise *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* und *Pseudomonas fluorescens*.

Das erfindungsgemäße Mittel zeichnet sich dadurch aus, daß es eine Kombination aus zwei Sonden umfaßt, die durch die Nukleotidsequenzen PAE1 und PAE2 gekennzeichnet sind. Erst die kombinierte Anwendung beider Sonden bewirkt einen sicher diskriminierenden Nachweis von *Ps. aeruginosa* und seiner Stämme von anderen *Pseudomonas*-Arten und deren Stämmen.

Die hier offenbarten Sonden binden spezifisch an Sequenzen der 16S rRNS an *Ps. aeruginosa*. Ein Keim, der mit beiden Sonden positiv reagiert, wird als *Ps. aeruginosa* identifiziert. Eine einzelne Identifizierungssonde kann die Identität von *Ps. aeruginosa* nicht garantieren. Nur die erfindungsgemäße Kombination aus beiden Sonden erlaubt die spezifische Identifizierung von *Ps. aeruginosa*.

50 Aus dem Stand der Technik sind bereits verschiedenen Lösungsansätze bekannt, um *Ps. aeruginosa* zu identifizieren. Im Vergleich zur vorliegenden Erfindung weisen die bekannten Verfahren jedoch gravierende Nachteile auf, die erfindungsgemäß vermieden werden. Der Stand der Technik wird nachfolgend diskutiert:

1. Standardnachweis in der Getränkebranche: Inkubation der Probe auf Cetrimide (US-Patent No 4072573, Aldridge et al., 1978) – Agar bei 41°C für 48 h. Beleuchten der Agarplatten mit ultravioletter Licht. Identifizierung von blaugrün fluoreszierenden Kolonien als *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Sonde zur Diagnose von *Pseudomonas aeruginosa* (US-Patent No 5798211, Appl. No. 921177, Ohno et al., 1998)

3. Isolierung verdächtiger Keime und Anzucht in Reinkultur. Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* durch Fourier-Transformations-Infrarot-Spektro-

skopie (Helm et al., 1991; Naumann et al., 1991).

4. Nukleinsäure-Sonden und Methoden zur Detektion von *Pseudomonas* der Gruppe I (US-Patent No. 5677127, Hogan et al., 1997; Gen-Probe Incorporated, Appl. No. 453439).

Die Nachteile der oben genannten Nachweisverfahren sind wie folgt.

Zu 1. Der Nachweis dauert zu lange (2 Tage). Bei zweifelhaften Resultaten (nur etwa 75% aller *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme bilden das Pigment Pyocyanin) müssen zur Prüfung langwierige Bestätigungstests (auf physiologische Eigenschaften) durchgeführt werden. Geschädigte und ausgehungerte Keime wachsen auf dem Selektivmedium nur noch schlecht oder nicht mehr an.

Zu 2. Die Bindungsstellen dieser 'Sonden' sind nicht bekannt, da es sich um HINDIII-Fragmente der DNS handelt, die in *E. coli* kloniert wurden. Dadurch ist die Produktion der Sonde aufwendig und teuer im Vergleich zu Oligonukleotiden. Ein Nachweis auf Einzelzellebene ist nicht möglich, da die Sonde gegen die DNS gerichtet ist und demnach zu wenige molekulare Zielstellen pro Zelle vorhanden sind. Die Sonde kann vermutlich nur für einen Nachweis in Nukleinsäureextrakten angewendet werden. Ferner ist nicht ersichtlich, ob mit der Sonde zwischen *Ps. aeruginosa* und nahe verwandten *Pseudomonas* unterschieden werden kann.

Zu 3. Mischkulturen können mit der FT-IR-Spektroskopie nicht analysiert werden. Daher ist die Gewinnung von Reinkulturen und deren Anzucht auf standardisierten Medien die Grundvoraussetzung für deren FT-IR-Analyse. Dementsprechend dauert die gesamte Nachweisprozedur mit mindestens 48 h zu lange.

Zu 4. Die entwickelte Sonde ist gegen die 23S rRNS gerichtet. Sie detektiert zwar *Ps. aeruginosa*, allerdings auch andere fluoreszierende *Pseudomonas*, wie z. B. *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* u.v.a. Eine Unterscheidung zwischen *Ps. aeruginosa* und anderen *Pseudomonas* der Gruppe I ist nicht möglich. Desweiteren kann diese Sonde nicht für den Einzelzellnachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mittels FISH verwendet werden, sondern nur für den Nachweis in Nukleinsäureextrakten.

Der erfindungsgemäß vorgeschlagene Weg, durch den Einsatz von mindestens zwei Sonden *Ps. aeruginosa* sicher von nahe verwandten Arten zu diskriminieren und hierbei Sonden auszuwählen, die spezifisch die 16S rRNS erkennen, ist neu und weist gegenüber dem genannten Stand der Technik auch eine erfinderische Leistung auf.

Das erfindungsgemäß vorgeschlagene Mittel zum Nachweis von *Ps. aeruginosa* umfaßt zumindest zwei Sonden mit den im Anspruch 1 genannten Sequenzen PAE1 und PAE2 sowie Derivate hiervon. Beim erfindungsgemäßen Nachweisverfahren werden zumindest 10 aufeinander folgende Nukleotide aus PAE1 und PAE2 in Kombination eingesetzt. Unter "Kombination" ist erfindungsgemäß sowohl der nacheinander erfolgende Einsatz von PAE1 und PAE2 als auch der Einsatz von PAE1 und PAE2 in einem Schritt zu verstehen.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfassen die Sonden mehr als 10 aufeinanderfolgende Nukleotide, bevorzugt 12 bis 26 Nukleotide, weiterhin bevorzugt 14 bis 22 Nukleotide, noch bevorzugter 16 bis 20 Nukleotide und insbesondere bevorzugt 18 Nukleotide. Es ist für den Fachmann offensichtlich, daß auch Sonden mit anderen Längen als die hier konkret beschriebenen eingesetzt werden können, soweit sie im Bereich von 12 bis 26 aufeinander folgenden Nukleotiden der Sequenzen PAE1 und PAE2 liegen. Insbesondere bevorzugt werden erfindungsgemäß Son-

den mit den nachfolgenden Sequenzen in Kombination eingesetzt:

gt. aac cgt ccc cct tgc g

5

gt gcc cac ccg agg tgc t.

Es ist für den Fachmann auch naheliegend, ausgehend von den hier offenbarten Sequenzen auch Abwandlungen dieser Sequenzen zur Detektion von *Ps. aeruginosa* einzusetzen. Unter "Abwandlungen" sind erfindungsgemäß Derivate der Sequenzen zu verstehen, bei denen ein, zwei oder drei Nukleotide an einem oder beiden Rändern der Sonde durch andere Nukleotide ersetzt wurden. Voraussetzung hierbei ist immer, daß eine spezifische Bindung an die 16 rRNS an *Ps. aeruginosa* beibehalten bleibt, so daß die erfindungsgemäß gestellte Aufgabe gelöst wird. Unter "Derivate" sind erfindungsgemäß aber auch solche Sonden zu verstehen, die sich von den Sonden PAE1 und PAE2 ableiten und bei denen im Inneren der Sonde ein oder zwei Nukleotide deletiert oder durch ein anderes Nukleotid ersetzt sind, wobei auch hier selbstverständlich nur solche Abwandlungen zu berücksichtigen sind, bei denen die spezifische Bindung an *Ps. aeruginosa*-Nukleotidsequenzen beibehalten bleibt. Ausgehend von den Nukleotidsequenzen der hier offenbarten Sonden kann der Fachmann durch einfaches Ausprobieren feststellen, welche Abwandlungen der Sequenzen zum hochspezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa* geeignet sind und welche nicht.

Von der Erfindung umfaßt werden auch die zu PAE1 und PAE2 und ihren Derivaten reversen Sequenzen und reverskomplementären Sequenzen.

Die in der vorliegenden Erfindung bereitgestellten Sonden werden in Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa* eingesetzt. Verfahren, bei denen DNA-Sonden zum spezifischen Nachweis eines Mikroorganismus eingesetzt werden, sind an sich bekannt. Der Fachmann kann diese an sich bekannten Verfahren mit den vorliegenden Sonden zur Anwendung bringen. Hierbei wird die DNA oder die RNA einer auf die Anwesenheit von *Ps. aeruginosa* zu untersuchenden Probe mit zumindest den zwei Sonden PAE1 und PAE2 oder Derivaten dieser Sonden, wie sie vorstehend näher beschrieben wurden, in Kontakt gebracht. Anschließend erfolgt der Nachweis der Hybridisierung der Sonden mit der RNA oder der DNA der Probe, um das Vorliegen von *Ps. aeruginosa* spezifischer DNA und/oder RNA-Sequenzen aufzuzeigen.

Erfindungsgemäß sind vielfältige Abwandlungen möglich, um die Sonden einzusetzen. So können die Sonden mit einer Markierung versehen werden, beispielsweise einer radioaktiven Markierung, Digoxigenin-, Peroxidase- oder Alkalische Phosphatase-Markierung, oder einer fluoreszierenden Markierung, um eine spezifische Hybridisierung mit *Ps. aeruginosa* spezifischer DNA oder RNA nachzuweisen.

Weitere Abwandlungen bzw. Derivatisierungen der Sonden sind z. B. PNAs, bei denen die heterozyklischen Basen an ein Protein-Rückgrat und nicht an ein Zucker-Phosphat-Rückgrat gebunden sind.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind die Sonden an eine Matrix gebunden (reverse Hybridisierungen), und es wird mit fluoreszenzmarkierter DNA oder einem PCR-Amplifikat hybridisiert. Beispiele für derartige Matrices sind Mikrochips und Mikrotiterplatten.

Vorstehend wurden bestimmte Derivatisierungen der Sonden beschrieben. Von der Erfindung umfaßt werden aber auch hier nicht gesondert beschriebene Derivate der Sonden bzw. der einzelnen Nukleotide der Sonden, beispielsweise chemische Änderungen an den Sonden, die das Nachweis-

verfahren erleichtern. Derartige Derivate sind dem Fachmann bekannt, und sie können auf die erfindungsgemäß bereitgestellten Sonden angewandt werden.

Die vorliegende Erfindung dient zum hochspezifischen Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mit Hilfe einer Kombination von mindestens zwei Sonden. Es ist bekannt, daß eine Art wie *Ps. aeruginosa* natürlicherweise uneinheitlich ist, d. h. sich in einzelne Stämme aufspaltet. Unter einem "Stamm" wird taxonomisch meist ein durch eine Stammnummer definierter Bakterienklon und dessen Nachkommen verstanden. Es gibt einen sogenannten Typstamm, der die Art und damit die Eigenschaften der Art repräsentiert. Da alle Stämme einer Art, wie beispielsweise *Ps. aeruginosa*, eng miteinander verwandt sind, können die erfindungsgemäß bereitgestellten Nachweisverfahren und Sonden selbstverständlich auch auf alle Stämme von *Ps. aeruginosa* angewandt werden.

Die DNA oder RNA der zu untersuchenden Probe wird entweder aus den Probenorganismen isoliert oder die Organismen werden in geeigneter Weise aufgeschlossen, so daß ein direkter Kontakt der Sonden mit der DNA und/oder der RNA der Probenorganismen ermöglicht wird, ohne daß vorher umfangreiche und zeitraubende Reinigungsprozeduren durchgeführt werden müssen.

Die Hybridisierung der Sonden mit der DNA und/oder der RNA der Probenorganismen erfolgt unter stringenten Bedingungen, bevorzugt hoch-stringenten Bedingungen. Diese Bedingungen werden nachfolgend näher ausgeführt.

Bei der Hybridisierung sind Reaktionspuffer und Waschpuffer aus folgenden funktionellen Komponenten zusammengesetzt:

- a) Puffersystem zur Einstellung und Stabilisierung des pH-Wertes zwischen 7 und 8 (z. B. Tris/HCl)
- b) Wasser als 'Lösungsmittel'
- c) Eventuell Chelatbildner, die bei niedrigen Konzentrationen monovalenter Kationen den Einfluß zweiwertiger Kationen (z. B. Ca^{2+}), die als Verunreinigung in Chemikalien enthalten sein können, verhindern. Wird insbesondere im Waschpuffer eingesetzt.
- d) Detergenz zur Erniedrigung der Oberflächenspannung von wäßrigen Lösungen
- e) Nichtionische, aprotische Detergenzien (z. B. Formamid) schwächen die Bindungsenergie von Nukleinsäure-Duplexmolekülen.
- f) Salz (funktionelle Einheit sind Kationen, die die negativen Ladungen der Nukleinsäure-Phosphatgruppen neutralisieren und dadurch die Duplexbildung von zwei einzelsträngigen Nukleinsäuren erleichtern (z. B. Na^+ in NaCl).

Vier Faktoren haben Einfluß auf das Zustandekommen von spezifischen Hybriden aus Sonde und Zielmolekül:

Die Komponenten e) und f) beeinflussen die Bindungsstärken von Nukleinsäure-Duplexmolekülen. Erhöhung der monovalenten Kationen in der Reaktions- bzw. Waschlösung stabilisiert die gebildeten Duplexmoleküle, während mit zunehmendem Gehalt an z. B. Formamid die Duplexbindungen geschwächt werden.

Eine geeignete Sondenkonzentration muß eingesetzt werden. Die Hybridisierung muß bei geeigneter Temperatur stattfinden (je höher die Temperatur, um so schwächer die Bindung der Hybride).

Unter stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen versteht man die Reaktionsbedingungen (die richtige Wahl der vier Faktoren), unter denen nur noch Duplexmoleküle zwischen Sonde und gewünschten Zielmolekülen (perfekte Hybride) entstehen bzw. nur noch der gewünschte

Zielorganismus nachgewiesen wird.

Unter stringenten Reaktionsbedingungen wird beispielsweise eine Hybridisierungstemperatur von ca. $5-10^\circ\text{C}$ unter dem jeweiligen Primerschmelzpunkt verstanden. Die Stabilität der DNA/DNA oder RNA/DNA-Hybriden muß selbst bei niedrigen Salzkonzentrationen entsprechend $0,1 \times \text{SSC}/0,5\% \text{ SDS}$ gewährleistet sein. Auf diese Weise kann der Ablauf unerwünschter Kreuzreaktionen mit anderen Spezies verhindert werden. Die jeweiligen Temperaturbedingungen können jedoch in Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen und in Abhängigkeit von der zu untersuchenden DNA-Probe unterschiedlich sein und müssen dann entsprechend angepaßt werden. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts kann beispielsweise durch Autoradiographie im Falle radioaktiv markierter Primermoleküle oder durch Fluorimetrie bei Verwendung von Fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden erfolgen.

Weitere Beispiele für stringente Bedingungen sind in den nachfolgenden Beispielen aufgeführt. Der Fachmann kann in an sich bekannter Weise die Bedingungen an das gewählte Untersuchungsverfahren anpassen, um tatsächlich stringente Bedingungen zu erzielen und ein spezifisches Nachweisverfahren zu ermöglichen. Geeignete Stringenzbedingungen lassen sich beispielsweise anhand von Referenzhybridisierungen ermitteln, bei denen DNA oder RNA von *Ps. aeruginosa* mit Proben weiterer *Pseudomonas*-Arten mit den erfindungsgemäß bereitgestellten Proben untersucht und verglichen wird.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die Sonden als Vorwärts- und Rückwärts-Primer für eine PCR-Reaktion eingesetzt.

Die obengenannten Sonden sind komplementär zu Bereichen der rRNS. Deshalb können diese Sonden an die rRNS binden. Sie können allerdings auch an den Anti-Sinn-DNS-Strang des rRNS-Gens (der ja sequenzgleich zur rRNS ist) binden. Zur Vervielfältigung des rRNS-Gen-Bereichs zwischen den beiden Sondenregionen mittels PCR muß ein Primer an den Anti-Sinn-Strang binden, der zweite Primer an den Sinn-Strang.

Als 'Vorwärtsprimer' ($\text{PAE}_{\text{vorwärts}}$) bietet sich der Bereich komplementär zu PAE2 ($5'\text{-ctt agt tac cag cac ctc ggg tgg gca Ctc taa gga ga-3}'$) an, als 'Rückwärtsprimer' ($\text{PAE}_{\text{rückwärts}}$) der Bereich PAE1 ($5'\text{-tca ctc cgt aac cgt ccc cct tgc ggt tag act agc tac ttc tg-3}'$).

Die oben beschriebenen Derivate und bevorzugten Abwandlungen können analog angewandt werden.

Bei Anwendung dieser Primer in der PCR sollte bei geeigneter Annealing-Temperatur nur bei Stämmen von *Ps. aeruginosa* ein spezifisches Amplifikat von 337 bp erzeugt werden. Als zu untersuchende Probe kann extrahierte DNS aus Reinkulturen oder Anreicherungen, bzw. ganze Zellen aus Reinkulturen oder Anreicherungen, bzw. Wasserproben vor und nach Anreicherungen, bzw. klinisches Material in die PCR eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Sonden ermöglichen somit einen hochspezifischen und schnellen Nachweis von Vertretern der Bakterienart *Ps. aeruginosa*. Beispielsweise kann durch die Markierung der Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen und deren Einsatz bei der FISH in fixierten Proben *Ps. aeruginosa* auf Einzelzellebene identifiziert werden, wenn eine Zelle zweifarbig fluoresziert. Hierdurch kann *Ps. aeruginosa* auch in Mischkulturen spezifisch nachgewiesen werden. Eine Anzucht auf selektiven Nährmedien und die Gewinnung von Reinkulturen ist nicht mehr notwendig. Die Identifizierung kann, da sie auf der optischen Wahrnehmung bzw. Messung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen beruht, auch von Laien vorgenommen werden.

Das PCR-Verfahren hat den Vorteil, daß sehr kleine DNA-Mengen nachweisbar sind. In Abhängigkeit von dem nachzuweisenden Material sind die Temperaturbedingungen und die Zykluszahlen der PCR abzuwandeln. Die optimalen Reaktionsbedingungen können durch Handversuche in an sich bekannter Weise ermittelt werden. Ein Beispiel für eine PCR ist wie folgt:

- Denaturierung der zu untersuchenden DNA-Probe bei 94°C mindestens 3 Minuten lang;
- Bindung der Sondenpaare 1 Minute lang bei 60°C an die beiden komplementären Einzelstränge der zu untersuchenden DNA;
- zweiminütige Verlängerungsreaktion der einzelnen Primer entlang der DNA-Matrize bei 72°C durch Verknüpfung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase;
- 30 bis 40 Reaktionszyklen jeweils bestehend aus: DNA-Denaturierung bei 94°C (30 Sekunden lang), gefolgt von Primerbindung bei 60°C (1 Minute lang), und Primerverlängerung bei 72°C (2 Minuten lang);
- Endreaktion zur Auffüllung der beiden 3'-Enden am Reaktionsprodukt bei 72°C (ca. 5–8 Minuten lang).

Die im Verlauf der PCR-Amplifikation durch die Verlängerung der Primersequenzen entstandenen, charakteristischen, speziesspezifischen DNA-Markerfragmente können beispielsweise gelelektrophoretisch oder fluorimetrisch unter Verwendung fluoreszenz-markierter Oligonukleotide nachgewiesen werden. Selbstverständlich sind auch andere, dem Fachmann bekannte Nachweisverfahren einsetzbar.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von nicht beschränkenden Ausführungsbeispielen und Abbildungen näher dargestellt. Die Abbildungen zeigen:

Abb. 1 Identifizierung von *Pseudomonas-aeruginosa*-Referenzstämmen und klinischen Isolaten mit rRNS-gerichteten Sonden.

Abb. 2 25 Isolate aus abgefülltem, nichtkarboniertem, natürlichem Mineralwasser.

Beispiel 1

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von fixiertem *Ps. aeruginosa* in Wasserproben (abgefülltes Mineralwasser, Quell- oder Tafelwasser) oder Flüssiganreicherungen daraus

250 ml Mineralwasser oder Bakterienanreicherung aus 250 ml in Flüssigmedium wird durch bakteriendichte, weiße Membranfilter (z. B. Polycarbonatfilter, Millipore G'TTP02500, Eschborn) mit Standard-Filtrationsanlagen filtriert. Anschließend werden die Filter in 5 ml 3% Paraformaldehydlösung (3% PFA) für 15 Minuten inkubiert (= fixiert). Nach Absaugen der Fixierungslösung wird 5 ml steriles Wasser auf den Filter gegeben und abgesaugt. Die Filter werden auf Glasobjektträger gelegt und mit 50 µl Hybridisierungslösung betropft (= 62,5 ng PAE1-CY3 und 250 ng PAE2-Fluorescein in Hybridisierungspuffer (0.9 M NaCl, 0.01 M Tris/HCl (pH 7.2–8.0), 0.01% SDS, 60% Formamid) und für 90 Minuten in einer geschlossenen Kammer unter äquimolarer Atmosphäre (z. B. Kammer enthält Tissue, das mit 2 ml des Hybridisierungspuffers getränkt ist) bei 46°C inkubiert. Daraufhin wird das Filter in 50 ml Waschlösung (14 mM NaCl, 0.01 M Tris/HCl, 0.01% SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0) für 15 Minuten bei 48 °C inkubiert, um ungebundene Sonde zu entfernen. Nach dem Trocknen wird das Filter auf eine Trägeroberfläche (z. B. Glasobjektträger) gelegt und mit Antifading-Medium betropft (z. B. Citifluor AF1, Citifluor Ltd., London) und mit einem Deck-

glas bedeckt. Zur Detektion der Signale wird das Filter im Epifluoreszenzmikroskop unter Anregung mit blauem und grünem Licht (ausgestattet mit Fluoreszenzfiltern für Fluorescein und Rhodamin) bei 400- bis 1000facher Vergrößerung untersucht. Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* fluoreszieren bei blauer Anregung grün und bei grüner Anregung rot.

Beispiel 2

Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* in Flüssiganreicherungen aus klinischen Proben in selektivem oder nichtselektivem Nährmedium auf Objektträgern

1 ml schwach trübe Flüssiganreicherung wird mit 1 ml absolutem Ethanol gemischt und mindestens 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Zentrifugation bei 5000 g 3 Minuten. Verwerfen des Überstandes. Resuspendieren des Pellets in 500 µl phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS-Puffer), Zugabe von 500 µl 100% Ethanol. Gut mischen. 10 µl der so präparierten Anreicherung in einem Reaktionsfeld des Hybridisierungs-Objektträgers verteilen (z. B. Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim, Deutschland; Art. Nr. 1215130 – Objektträger mit 6 Reaktionsfeldern) und 10 min bei 46°C aufdrehen lassen. 6 unterschiedliche Proben können auf einem der oben genannten Objektträger aufgebracht und gleichzeitig untersucht werden.

Der Objektträger muß für je 3 Minuten in 50%, 70% und 100% Ethanol inkubiert werden. Nach dem Trocknen wird auf jedes der mit einer Probe versehene Reaktionsfeld mit je 10 µl Hybridisierungslösung (= 12.5 ng PAE1-CY3 und 50 ng PAE2-Fluorescein in in Hybridisierungspuffer (0.9 M NaCl, 0.01 M Tris/HCl (pH 7.2–8.0), 0.01% SDS, 60% Formamid)) überschichtet und für 90 Minuten in einer geschlossenen Kammer unter äquimolarer Atmosphäre (z. B. Kammer enthält Tissue, das mit 2 ml des Hybridisierungspuffers getränkt ist) bei 46°C inkubiert. Daraufhin wird die Hybridisierungslösung mit auf 48°C vorgewärmter Waschlösung (14 mM NaCl, 0.01 M Tris/HCl, 0.01% SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0)) vom Objektträger gespült und dieser in 50 ml Waschlösung für 15 Minuten bei 48°C inkubiert, um ungebundene Sonde zu entfernen. Objektträger kurz vorsichtig mit destilliertem Wasser abspülen und trocknen lassen. Den Objektträger mit Antifading-Medium betropfen (z. B. Citifluor AF1, Citifluor Ltd., London) und mit Deckglas bedecken. Zur Detektion der Signale werden die einzelnen Reaktionsfelder im Epifluoreszenzmikroskop unter Anregung mit blauem und grünem Licht (ausgestattet mit Fluoreszenzfiltern für Fluorescein und Rhodamin) bei 400- bis 1000facher Vergrößerung untersucht. Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* fluoreszieren bei blauer Anregung grün und bei grüner Anregung rot.

Beispiel 3

Schnellscreening von auf selektiven oder nichtselektiven Nähragarplatten gewachsenen Kolonien aus klinischen Proben, Umweltproben oder Mineral-, Quell- und Tafelwasserproben bzw. deren Produkten zur Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa*

Vertiefungen einer sterilen Mikrotiterplatte werden mit je 50 µl PBS-Puffer gefüllt. Mit sterilen Zahnstochern werden nun Proben der Bakterienkolonien von der Agarplatte in den Vertiefungen suspendiert. Zugabe von je 50 µl 100% Ethanol in die Vertiefungen, die suspendierte Kolonienproben enthalten. Mischen. Je 10 µl der so fixierten Proben pro Reaktionsfeld des Hybridisierungs-Objektträgers verteilen

(z. B. Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim, Deutschland; Art. Nr. 1215130 – Objektträger mit 6 Reaktionsfeldern) und 10 min bei 46°C austrocknen lassen. 6 verschiedene fixierte Kolonien können auf einem der oben genannten Objektträger aufgebracht und gleichzeitig untersucht werden.

Nach Auftrocknung der Proben muß der Objektträger für je 3 Minuten in 50%, 70% und 100% Ethanol inkubiert werden. Nach dem Trocknen wird jedes der mit einer Probe einer fixierten Kolonie versehenen Reaktionsfelder mit je 10 µl Hybridisierungslösung (= 12.5 ng PAE1-CY3 und 50 ng PAE2-Fluorescein in in Hybridisierungspuffer (0.9 M NaCl, 0.01 M Tris/HCl (pH 7.2–8.0), 0.01% SDS, 60% Formamid)) überschichtet und für 90 Minuten in einer geschlossenen Kammer unter äquimolarer Atmosphäre (z. B. Kammer enthält Tissue, das mit 2 ml des Hybridisierungspuffers getränkt ist) bei 46°C inkubiert. Daraufhin wird die Hybridisierungslösung mit auf 48°C vorgewärmter Waschlösung (14 mM NaCl, 0.01 M Tris/HCl, 0.01% SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0)) vom Objektträger gespült und dieser in 50 ml Waschlösung für 15 Minuten bei 48°C inkubiert, um ungebundene Sonde zu entfernen. Objektträger kurz vorsichtig mit destilliertem Wasser abspülen und trocknen lassen. Objektträger mit Antifading-Medium betropfen (z. B. Citifluor AF1, Citifluor Ltd., London) und mit Deckglas bedecken. Zur Detektion der Signale werden die einzelnen Reaktionsfelder im Epifluoreszenzmikroskop unter Anregung mit blauem und grünem Licht (ausgestattet mit Fluoreszenzfiltern für Fluorescein und Rhodamin) bei 400- bis 1000facher Vergrößerung untersucht. Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* fluoreszieren bei blauer Anregung grün und bei grüner Anregung rot.

Beispiel 4

Eventuelle Anwendung: Direkte in-situ-Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* im Mucus von Patienten mit cystischer Fibrose (= Mukoviszidose-Patienten)

Mucusprobe wird in 100–1000 µl PBS-Puffer (pH 7,2–7,4) eingebracht und mit 100–1000 µl absolutem Ethanol gemischt und mindestens 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Fixierte Mucusprobe auf Reaktionsfeld des Hybridisierungs-Objektträgers verteilen (z. B. Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim, Deutschland; Art. Nr. 1215130 – Objektträger mit 6 Reaktionsfeldern) und 10 min bei 46°C austrocknen lassen. 6 unterschiedliche Proben können auf einem der oben genannten Objektträger aufgebracht und gleichzeitig untersucht werden.

Der Objektträger muß für je 3 Minuten in 50%, 70% und 100% Ethanol inkubiert werden. Nach dem Trocknen wird jedes der mit einer Probe versehenen Reaktionsfelder mit je 10 µl Hybridisierungslösung (= 12.5 ng PAE1-CY3 und 50 ng PAE2-Fluorescein in in Hybridisierungspuffer (0.9 M NaCl, 0.01 M Tris/HCl (pH 7.2–8.0), 0.01% SDS, 60% Formamid)) überschichtet und für 90 Minuten in einer geschlossenen Kammer unter äquimolarer Atmosphäre (z. B. Kammer enthält Tissue, das mit 2 ml des Hybridisierungspuffers getränkt ist) bei 46°C inkubiert. Daraufhin wird die Hybridisierungslösung mit auf 48°C vorgewärmter Waschlösung (14 mM NaCl, 0.01 M Tris/HCl, 0.01% SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0)) vom Objektträger gespült und dieser in 50 ml Waschlösung für 15 Minuten bei 48°C inkubiert, um ungebundene Sonde zu entfernen. Objektträger kurz vorsichtig mit destilliertem Wasser abspülen und trocknen lassen. Objektträger mit Antifading – Medium betropfen (z. B. Citifluor AF1, Citifluor Ltd., London) und mit Deckglas bedecken. Zur Detektion der Signale werden die einzelnen Reaktionsfelder im Epifluoreszenzmikroskop unter Anregung

mit blauem und grünem Licht (ausgestattet mit Fluoreszenzfiltern für Fluorescein und Rhodamin) bei 400- bis 1000facher Vergrößerung untersucht. Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* fluoreszieren bei blauer Anregung grün und bei grüner Anregung rot.

Patentansprüche

1. Mittel zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zumindest zwei Sonden mit je zumindest zehn aufeinanderfolgenden Nukleotiden der nachfolgenden zwei Sequenzen enthält:

PAE1: 5'-tca ctc cgt ggt aac cgt ccc cct tgc ggt tag act agc tac ttc tg-3'

PAE2: 5'-tct cct tag agt gcc cac ccg agg tgc tgg taa cta ag-3'

und/oder zumindest ein oder zwei Derivate dieser Sequenzen, die je in Kombination von zumindest zwei dieser Sequenzen zum spezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa* geeignet sind.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Derivat eine Sonde mit zumindest 12–26 aufeinanderfolgenden Nukleotiden ist.

3. Mittel nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Derivat eine Sonde mit 14–22, bevorzugt 18 aufeinanderfolgenden Nukleotiden ist.

4. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Sonde eine Kombination der nachfolgenden zwei Nukleotidsequenzen eingesetzt wird:

gt aac cgt ccc cct tgc g

gt gcc cac ccg agg tgc t.

5. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein, zwei oder drei der Nukleotide an einem oder beiden Rändern der Sonde und/oder ein oder zwei Nukleotide im Inneren der Sonde deletiert oder durch ein anderes Nukleotid ersetzt sind, wobei die spezifische Bindung an *Ps. aeruginosa* beibehalten bleibt.

6. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es die komplementäre Sequenz oder die reverse oder reverskomplementäre Sequenz der Sonden umfaßt.

7. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es spezifisch zu Sequenzen der 16S rRNA von *Ps. aeruginosa* komplementär ist.

8. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden eine Markierung aufweisen.

9. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Digoxigeninmarkierung, Peroxidase markierung oder Alkalische-Phosphatase-Markierung ist.

10. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es an eine Festphasenmatrix gebunden vorliegt.

11. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden chemisch modifiziert vorliegen.

12. Mittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die heterozyklischen Basen an ein Protein-Rückgrat gebunden vorliegen.

13. Verwendung eines Mittels nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, welches zumindest die zwei Sonden PAE1 und PAE2 oder Derivate hiervon nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche enthält, zum spezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa*.

14. Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Ps. aeruginosa* mit den nachfolgenden Verfahrensschritten: Inkontaktbringen der DNA oder der RNA einer auf die Anwesenheit von *Ps. aeruginosa* zu untersuchenden Probe mit zumindest den zwei Sonden PAE1 und PAE2 und/oder ihren Derivaten nach einem der vorhergehenden Ansprüche und Nachweis der Hybridisierung der Sonden mit der RNA oder der DNA der Probe, um das Vorliegen von *Ps. aeruginosa* spezifischer DNA- und/oder RNA-Sequenzen aufzuzeigen.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Inkontaktbringen unter stringenten Bedingungen erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden als Vorwärts- und Rückwärts-Primer für eine PCR-Reaktion eingesetzt werden, um den Bereich zwischen den Sonden auf dem Gen für die rRNA zu vervielfältigen, und nachfolgender Nachweis des vervielfältigten, für *Ps. aeruginosa* spezifischen Bereichs der rRNA.

17. Kit, dadurch gekennzeichnet, daß es zumindest ein Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche aufweist.

18. Festphasenmatrix, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest eine der Sonden, wie sie in einem der Ansprüche 1-8 definiert sind, an die Matrix gebunden aufweist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* Referenzstämmen und klinischen Isolaten mit rRNS-gerichteten Sonden

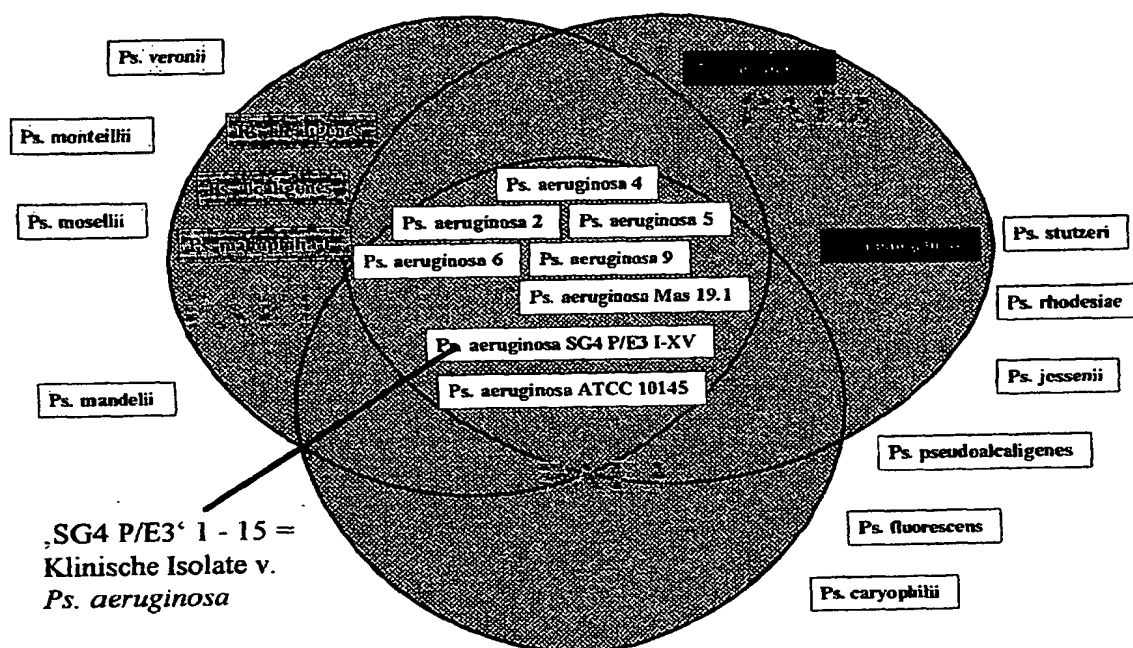


Abb. 1

25 Isolate aus abgefülltem nichtkarboniertem natürlichem Mineralwasser

Reaktion der rRNS-gerichteten Sonden - Spezifität von PAE1+2 für *Ps. aeruginosa*

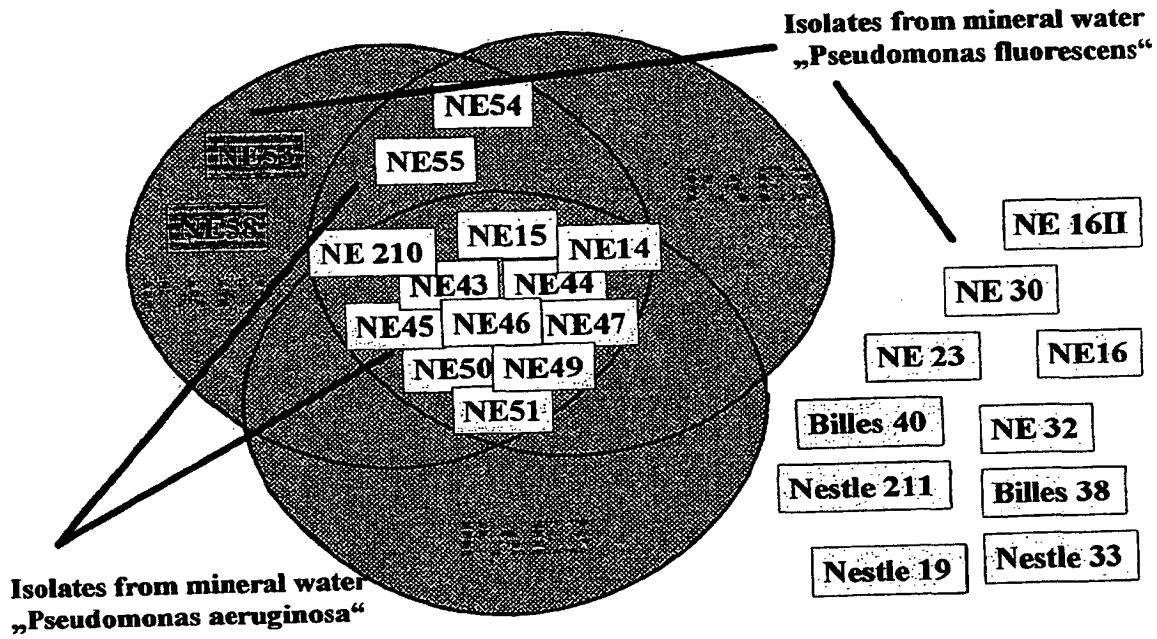


Abb. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)